

УДК 577.12

## ЕДИНСТВЕННАЯ ОСТАНОВЛЕННАЯ 80S РИБСОМА ПРЕПЯТСТВУЕТ ВОВЛЕЧЕНИЮ мРНК В СТРЕСС-ГРАНУЛЫ

© 2023 А.Г. Федоровский<sup>1,2</sup>, А.В. Бураков<sup>1</sup>, И.М. Теренин<sup>1,3</sup>, Д.А. Быков<sup>1,4,5</sup>,  
К.А. Лашкевич<sup>1</sup>, В.И. Попенко<sup>5</sup>, Н.Е. Макарова<sup>1#</sup>, И.И. Сорокин<sup>1&</sup>, А.П. Сухинина<sup>1,6</sup>,  
В.С. Прасолов<sup>5</sup>, П.В. Иванов<sup>7</sup>, С.Е. Дмитриев<sup>1,5,6\*</sup>

<sup>1</sup> НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет наук о материалах, 119234 Москва, Россия

<sup>3</sup> Научно-технологический университет «Сириус»,  
354340 Краснодарский край, пгт Сириус, Россия

<sup>4</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия

<sup>5</sup> Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991 Москва, Россия

<sup>6</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
факультет биоинженерии и биоинформатики, 119234 Москва, Россия

<sup>7</sup> Гарвардская школа медицины, Женский госпиталь Бригхэма, Отдел медицины,  
02115 Бостон, МА, США

Поступила в редакцию 23.11.2022

После доработки 31.08.2023

Принята к публикации 11.09.2023

В ответ на стрессорирующие воздействия клетки эукариот обычно подавляют биосинтез белка. Это вызывает высвобождение мРНК из полисом, их конденсацию с участием мРНК-связывающих белков и образование немембранных внутрицитоплазматических компартментов, называемых стресс-гранулами (СГ). В СГ присутствуют 40S, но не обнаруживаются 60S субчастицы рибосом. Известно, что рибосомные ингибиторы циклогексимид, эметин и анизомицин, блокирующие продвижение 80S рибосом по мРНК и стабилизирующие таким образом полисомы, предотвращают образование СГ. Напротив, индуктор преждевременной терминации пурамицин, полностью освобождающий мРНК от рибосом, стимулирует образование СГ. Такой же эффект оказывают и некоторые специфические ингибиторы инициации трансляции, приводящие к накоплению освобождённых из полисом мРНК в форме остановленных 48S преинициаторных комплексов. На основании этих и других данных принято считать, что триггером образования СГ является появление в клетке мРНК с освобождёнными от рибосом протяжёнными участками, которые склонны образовывать конденсаты. В данной работе мы оценили способность различных низкомолекулярных ингибиторов трансляции блокировать или стимулировать сборку СГ в условиях окислительного стресса, вызываемого арсенитом натрия. Вопреки ожиданиям, мы обнаружили, что рибосом-направленные ингибиторы элонгации особого типа, которые останавливают единственную 80S рибосому в начале кодирующей области, но не мешают всем последующим рибосомам закончить трансляцию и покинуть мРНК (например, харрингтонин, лактимидомицин или Т-2 токсин), полностью предотвращают образование арсенит-индуцированных СГ. Эти наблюдения позволяют заключить, что присутствия даже одной 80S рибосомы на мРНК достаточно для того, чтобы воспрепятствовать её вовлечению в СГ, а для формирования СГ недостаточно наличия протяжённых областей мРНК, свободных от рибосом. Мы предполагаем, что вхождение мРНК в СГ может быть опосредовано специфическими контактами между РНК-связывающими белками и теми участками находящимися на этих мРНК 40S субчастиц, которые оказываются недоступными в случае ассоциированных рибосом.

Принятые сокращения: НТО – нетранслируемая область; РНП – рибонуклеопротеин; СГ – стресс-гранулы.

\* Адресат для корреспонденции.

# Нынешнее место работы: отдел генетики, микробиологии и статистики, биологический факультет, Университет Барселоны, 08028 Барселона, Каталония, Испания.

& Нынешнее место работы: Гронингский институт биомолекулярных наук и биотехнологии, Гронингский университет, 9747 AG Гронинген, Нидерланды.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стресс-гранулы, фазовое разделение «жидкость-жидкость», низкомолекулярные ингибиторы трансляции, рибосомные ингибиторы, элонгация, полисомы, харрингтонин, лактимидомицин, T-2 токсин, остановленная рибосома.

**DOI:** 10.31857/S0320972523110118, **EDN:** MLWTCS

## ВВЕДЕНИЕ

Эукариотическая клетка способна оперативно реагировать на резкие изменения внешних условий, запуская программу стрессового ответа, одним из неотъемлемых элементов которого, как правило, является быстрое подавление белкового синтеза [1]. Во многих случаях стресс-индуцированное подавление трансляции сопровождается образованием специализированных рибонуклеопротеиновых конденсатов в цитоплазме клеток, называемых стресс-гранулами (СГ) [2–5]. Принято считать, что СГ вносят вклад в выживаемость клеток в условиях стресса, обеспечивая оптимальное пространственное распределение мРНК и компонентов трансляционного аппарата при остановке трансляции и при её последующем возобновлении, а также являются частью врождённого иммунитета, необходимого для защиты от вирусов [3, 5–8].

В состав СГ входят нетранслируемые мРНК, рибосомные 40S субчастицы и целый ряд белков: прежде всего, несколько факторов инициации трансляции, которые в нормальных условиях являются компонентами преинициаторного 48S комплекса [9], и некоторые другие трансляционные факторы (см. работу Makeeva et al. [10] и ссылки в ней), а также множество мРНК-связывающих белков (см., напр., работы Harvey et al., Kedersha et al., Matsuki et al. и Mazroui et al. [11–14]), участники внутриклеточной сигнализации [15] и прочие компоненты белок-синтезирующего аппарата (подробнее см. в обзорах Bhattar et al., Guzikowski et al., Ivanov et al., Protter et al. и Riggs et al. [1–5]). Некоторые из них непосредственно участвуют в регуляции образования СГ, другие вовлекаются благодаря взаимодействию с различными компонентами гранул. Количество белков, обнаруживаемых в СГ, значительно расширилось за последние несколько лет благодаря применению методов проксимального мечения [16–20].

Механизмы образования СГ изучены недостаточно. Однако ключевым принципом их формирования является так называемое фазовое разделение «жидкость-жидкость» (англ. liquid-liquid phase separation, LLPS), связанное со свойствами самих биополимеров: РНК и РНК-связывающих белков, имеющих неструк-

турированные или повторяющиеся участки, склонные к образованию избыточных контактов [21–30]. Предполагается, что межмолекулярное спаривание оснований нетранслируемых мРНК приводит к их агрегации, а взаимодействие с РНК-связывающими белками обеспечивает формирование рибонуклеопротеиновых (РНП) гранул [22, 27, 31]. Большую роль в этом процессе играют также белок-белковые взаимодействия с участием внутренне неупорядоченных областей [4, 32]. Важными участниками формирования СГ являются белки G3BP1/2, которые в условиях стресса переходят из неактивного компактного состояния в частично развёрнутую конформацию, способствующую кооперативным РНК-белковым взаимодействиям [33, 34]. Это приводит к сборке РНП-кластеров, в которых молекулы мРНК и белков объединены в гетерогенные конденсаты.

Анализ транскриптома СГ показал, что, несмотря на наличие некоторой специфичности, практически все мРНК в клетке в той или иной степени участвуют в их формировании [35]. Неэффективно транслируемые мРНК, а также транскрипты с длинными кодирующими частями и 3'-НТО оказались сильнее представлены в СГ [35, 36], что указывает на роль РНК-РНК-взаимодействий между свободными от рибосом участками мРНК. Интересно, что в каждый конкретный момент в состав СГ входит лишь небольшая доля (~10%) всех клеточных мРНК [35], которые динамически обмениваются с пулом свободных мРНК в цитоплазме [37–39].

Согласно классической модели, в СГ накапливаются именно нетранслируемые мРНК, не связанные с рибосомами [9, 37, 40]. Это согласуется с тем, что в них, несмотря на присутствие 40S субчастиц рибосом, не обнаруживаются 60S субчастицы – что подтверждается как иммунофлуоресцентными методами [9, 41, 42], так и анализом распределения 18S и 28S рРНК [43]. Тем не менее недавно выяснилось, что некоторые активно транслируемые мРНК могут временно взаимодействовать с СГ [44] и даже, возможно, находиться непосредственно внутри них [45], а утверждение о полном отсутствии 60S субчастиц в СГ не так однозначно [45, 46]. Впрочем, в том, что компонентом СГ в основном являются именно нетрансли-

руемые мРНК, сомневаться всё-таки не приходится [45].

Так или иначе, во всех существующих моделях ключевым условием формирования СГ признаётся появление в клетке протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом. Хотя само по себе это условие не всегда является триггером сборки СГ, обычно оно способствует их формированию. Так, к сборке СГ приводит блокировка инициации трансляции самыми разными способами. Например, индукторами их образования являются стрессовые воздействия, приводящие к инактивации фактора eIF2, доставляющего Met-тРНК<sub>i</sub> в преинициаторный комплекс [12], или ингибиторы РНК-хеликазы eIF4A, участвующей в рибосомном сканировании [47–50]. Также образование СГ запускает снижение уровней eIF4B, eIF4H или PABP, и в меньшей степени – истощение кэп-связывающего белка eIF4E или предотвращение его вхождения в состав eIF4F [51–53]. Интересно, что вмешательство в последнюю стадию инициации трансляции (присоединение 60S субчастицы) с помощью низкомолекулярного ингибитора MDMP либо путём истощения белка L28 не индуцирует образование СГ и не влияет на их сборку [51].

Формирование СГ стимулирует также рибосомный ингибитор пуромицин, вызывающий преждевременную терминацию и разбирающий полисомы [37], а в некоторых случаях это вещество даже вызывает сборку СГ само по себе, без каких-либо дополнительных воздействий [37, 54]. Напротив, стабилизация полисом с помощью классических ингибиторов элонгации – циклогексимида, эметина и анизомицина – препятствует сборке СГ в клетке в условиях стресса [14, 37–39, 51, 55].

Эти факты также укладываются в модель, согласно которой именно протяжённые участки мРНК, свободные от рибосом, служат основным РНК-компонентом СГ и во многом определяют их формирование. В данной работе мы решили проверить, действительно ли это так. Для этого мы проанализировали, какие эффекты оказывают на формирование СГ, вызванное классическим индуктором – арсенитом натрия, различные низкомолекулярные ингибиторы рибосомы. Широкое разнообразие их свойств [56] позволяет с их помощью не только стабилизировать или полностью разобрать полисомы, но и обеспечивать нахождение на мРНК всего одной 80S рибосомы в начале кодирующей части. Мы выяснили, что в последнем случае СГ также не образовывались. Это свидетельствует о том, что мРНК, с которыми связана всего одна-единственная рибо-

сома, не могут вовлекаться в СГ, несмотря на наличие у них протяжённых свободных участков. По-видимому, 80S рибосома сама по себе препятствует уходу мРНК в СГ. Эти факты ставят вопросы об активной роли рибосомы в исключении транслирующихся мРНК из СГ и об универсальности классической модели, описывающей механизм сборки СГ.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культивирование клеток, индукция стресса и обработка ингибиторами трансляции.** Клетки линии HeLa выращивали в среде DMEM («Gibco», США) с аланил-глутамином («ПанЭко», Россия) и 10% FBS («HyClone», США) в присутствии пенициллина и стрептомицина («ПанЭко») во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> при 37 °С. Использовали следующие ингибиторы трансляции (в скобках указаны производитель, концентрация стокового раствора и растворитель): циклогексимид («Sigma-Aldrich», США, 10 мг/мл в воде), цефалин («Cayman Chemical», США, 10 мМ в этаноле), анизомицин («Sigma-Aldrich», 50 мМ в DMSO), пуромицин («Santa Cruz Biotechnology», США, 100 мМ в воде), лактимидомицин («Sigma-Aldrich», 2 мМ в DMSO), харрингтонин («Santa Cruz Biotechnology», 10 мг/мл в DMSO), T-2 токсин («Cayman Chemical», 10 мМ в DMSO), пактамицин («Sigma-Aldrich», 10 мМ в DMSO), торин-1 («Tocris Bioscience», Великобритания, 10 мМ в DMSO). Стоковые растворы перед использованием разводили водой или буфером PBS до удобных для добавления к клеткам концентраций (см. ниже). Для индукции образования СГ клетки подвергали воздействию 100 мкМ арсенита натрия (NaH<sub>2</sub>AsO<sub>3</sub>, «Sigma-Aldrich») на протяжении указанного времени.

**мРНК-трансфекция.** Для мРНК-трансфекции клетки HeLa накануне рассеивали в 96-луночный белый планшет FB/НВ («Greiner», Австрия) в объёме 75 мкл на лунку, пространство между ячейками заполняли стерильной водой. m<sup>7</sup>G-Кэпированная полиаденилированная мРНК, кодирующая люциферазу светлячка (Fluc) и содержащая 5'-нетранслируемую область (НТО) мРНК β-актина человека и 3'-НТО вируса SV40, полученная по описанному ранее протоколу [57], была любезно предоставлена Е.А. Пановой (ФББ МГУ). мРНК-трансфекцию проводили с помощью реагента GenJector-U («Moloca», Россия) при плотности клеток ~75%, как описано в работе Akulich et al. [58]. При приготовлении трансфицирующих смесей в буфер PBS к мРНК



и реагенту добавляли D-люциферин («Promega», США) из такого расчёта, чтобы его конечная концентрация в лунке с клетками составила 0,4 мМ. Для изучения действия арсенита на трансляцию мРНК его добавляли до указанных концентраций за 1 ч до трансфекции. Непосредственно перед трансфекцией в лунки добавляли ингибиторы трансляции в виде соответствующих 10-кратных растворов. Затем клетки помещали в мультимодальный планшетный ридер CLARIOstar («BMG LABTECH», Германия) и измеряли активность люциферазы прижизненно на протяжении 24 ч, как описано в работе Panova et al. [59]. Для дальнейших расчётов брали значения в точке 10 ч, примерно соответствующей середине линейного участка кривой (кроме опыта с арсенитом натрия, для которого были взяты точки 2 ч). Все трансфекции повторяли не менее двух раз на разных пассажах клеток, в трёх повторностях, затем рассчитывали средние значения и стандартное отклонение.

**Анализ полисомного профиля.** Клетки HeLa высевали на 10-см чашки и после того, как культура достигала плотности ~75%, добавляли рибосомные ингибиторы до указанных концентраций и инкубировали 30 мин, либо добавляли арсенит натрия до 100 мкМ и инкубировали 1 ч. Дальнейшие действия проводили согласно протоколу, описанному в работе Andreev et al. [60], с небольшими изменениями. Клетки промывали охлаждённым во льду PBS и лизировали в 200 мкл буфера, содержащего 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 250 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 0,5% Triton X-100, 0,1 мг/мл циклогексимида и 20 ед./мл ДНКазы TURBO («Ambion», США). Лизаты инкубировали 10 мин на льду, центрифугировали 10 мин при 16 000 g и +4 °С, супернатант наносили на градиент плотности сахарозы 10–60% (m/v), 11 мл, содержащий 20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 250 мМ NaCl, 15 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ DTT и 0,1 мг/мл циклогексимида, и центрифугировали в роторе SW-41 при 35 000 об./мин в течение 3 ч, после чего градиент вручную разделяли на аликвоты по 300 мл и измеряли A<sub>260</sub> в 96-луночных планшетах UV-Transparent («Corning», США) с помощью планшетного ридера Infinite 200 PRO («TECAN», Швейцария). Полученные значения нормировали на сумму значений A<sub>260</sub> для всех аликвот из данной пробирки.

**Иммуноцитохимический анализ и микроскопия.** Для иммуноокрашивания клетки HeLa выращивали до плотности ~70% на покровных стёклах, добавляли рибосомные ингибиторы до указанных концентраций и выдерживали

30 мин, после чего индуцировали окислительный стресс добавлением 100 мкМ арсенита натрия. Через 1 ч клетки фиксировали безводным метанолом при –20 °С в течение 7 мин, затем постфиксировали свежеприготовленным 3%-ным параформальдегидом в PBS при +4 °С в течение 30 мин и отмывали PBS при комнатной температуре 2 раза по 15 мин. После этого осуществляли пермеабиллизацию 0,5%-ным Triton X-100 в течение 2 мин, забивку 3%-ным BSA 15 мин и отмывку PBS 15 мин, а затем гибридизовали с первичными мышинными анти-G3BP1 (H-10) антителами («Santa Cruz Biotechnology») при комнатной температуре в течение 1 ч с последующей отмывкой PBS (3 раза по 5 мин), инкубацией со вторичными анти-мышинными IgG-специфичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 («Invitrogen», США), при тех же условиях и с аналогичной отмывкой. После этого проводили окраску ядер красителем Hoechst 33342 («Thermo Fisher Scientific», США) и монтировали покровные стекла с использованием поливинилового заливающего среда Aqua-Poly/Mount («Polysciences Inc», США). Микроскопию препаратов проводили на конфокальном микроскопе Zeiss LSM900 («Carl Zeiss AG», Германия, приобретён при поддержке Программы развития МГУ). На рисунках для каждой панели представлена сумма всех кадров соответствующей Z-стопки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Выбор низкомолекулярных ингибиторов.

Для анализа были выбраны следующие рибосомные ингибиторы: циклогексимид, цефалин (аналог эметина), анизомидин, пуромицин, лактимидомицин, харрингтонин, T-2 токсин и пактамицин, а также ингибитор киназы mTOR торин-1 [56]. Их структура и важные для данного исследования свойства отражены в таблице.

Циклогексимид связывается с E-сайтом рибосомной 60S субчастицы, блокирует трансляцию и стабилизирует полисомы. Цефалин (6'-O-деметилэметин) также блокирует трансляцию, однако взаимодействует с малой субчастицей, а не с большой. Анизомидин связывается с A-сайтом 60S субчастицы и ингибирует пептидилтрансферазную реакцию. Наконец, пуромицин имитирует аминокислотированный CCA-конец тРНК и, связываясь с A-сайтом рибосомы, вызывает преждевременную терминацию и высвобождение пептида, разбирая полисомы. Эти ингибиторы были

Структура и функциональные свойства низкомолекулярных ингибиторов трансляции, использованных в данной работе

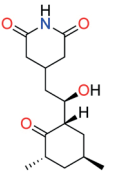
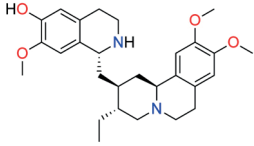
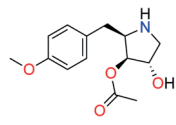
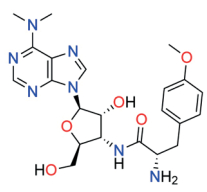
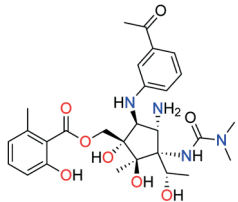
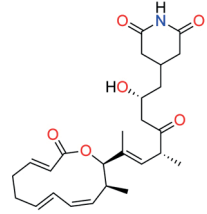
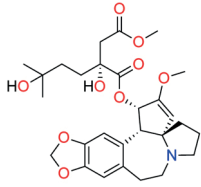
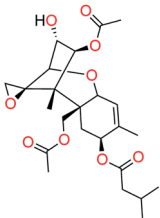
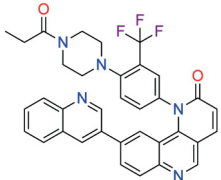
Название ингибитора (PubChem CID)	Структурная формула	Мишень (участок связывания)	Механизм действия	Влияние на полисомы	Влияние на сборку стресс-гранул
Циклогексимид (6197)		60S (E-сайт)	ингибирует транслокацию, препятствуя перемещению ССА-конца деацилированной тРНК в E-сайт	стабилизирует	препятствует сборке [14, 38, 51]
Цефалин (442195), аналог эметина		40S (напротив E-сайта)	ингибирует транслокацию	стабилизирует	препятствует сборке (показано для эметина) [37, 39]
Анизомизин (253602)		60S (A-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, дестабилизируя связывание Аа-тРНК в А-сайте	стабилизирует	препятствует сборке [55]
Пуромизин (439530)		60S (A-сайт)	вызывает преждевременную терминацию, имитируя аминокислотированный ССА-конец тРНК	разбирает	способствует сборке [37, 54]
Пактамицин (5289124)		40S (напротив E-сайта)	ингибирует транслокацию	разбирает	неизвестен
Лактимидомизин (11669726)		60S (E-сайт)	ингибирует транслокацию, препятствуя перемещению ССА-конца деацилированной тРНК в E-сайт; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен

Таблица (окончание)

Название ингибитора (PubChem CID)	Структурная формула	Мишень (участок связывания)	Механизм действия	Влияние на полисомы	Влияние на сборку стресс-гранул
Харрингтонин (276389)		60S (А-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, препятствуя аккомодации аминоацильного остатка Аа-тРНК в А-сайте; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен
Т-2 токсин (5284461)		60S (А-сайт)	ингибирует пептидилтрансферазный центр, препятствуя аккомодации аминоацильного остатка Аа-тРНК в А-сайте; способен связываться только с вакантной рибосомой	разбирает	неизвестен
Торин-1 (49836027)		mTOR (активный центр)	инактивация mTOR приводит к дефосфорилированию 4E-BP1 и нарушению взаимодействия кэп-связывающего белка eIF4E с партнёром eIF4G, угнетая кэп-зависимую трансляцию	разбирает	незначительно ингибирует [61, 62]

Примечание. Структурные формулы веществ взяты из базы данных PubChem [63], данные о механизме работы – из обзора Dmitriev et al. [56].

взяты в качестве контроля, т.к. их влияние на сборку СГ хорошо задокументировано: ожидается, что вещества, стабилизирующие полисомы (такие как циклогексимид, эметин и анизомицин), будут препятствовать формированию СГ [14, 37–39, 51, 55], в то время как разбирающий полисомы пурамицин, наоборот, его простимулирует [37, 54].

Задачей же данного исследования было выяснить, как повлияют на сборку СГ «неканонические» ингибиторы элонгации, воздействие которых парадоксальным образом приводит к разборке полисом [56]. Так, например, пактамицин (который связывается примерно с тем же участком рибосомной 40S субчастицы, что и эметин) из-за этого свойства долгое время считали ингибитором инициации трансляции [64]; однако сейчас известно, что он всё же блокирует транслокацию, хотя точный механизм его работы по-прежнему неясен [65, 66]. Лактимидомицин, относящийся к той же группе веществ (глутаримидам), что и циклогексимид [67], и взаимодействующий

с тем же участком 60S субчастицы, из-за более крупного размера молекулы не способен продуктивно конкурировать с деацелированной тРНК на активно транскрибирующей рибосоме [68]. Видимо, по этой причине он связывается исключительно с 60S субчастицей, только что прибывшей на стартовый кодон в процессе инициации трансляции и имеющей вакантный Е-сайт, и таким образом блокирует только одну (5'-проксимальную) рибосому на всей кодирующей части, из-за чего его добавление приводит не к стабилизации, а к разборке полисом до моносом [67, 69]. Харрингтонин и Т-2 токсин – ингибиторы пептидилтрансферазного центра, но их связывание имеет ту же особенность, что и у лактимидомицина: они блокируют исключительно вновь проинициировавшие рибосомы, и поэтому при их добавлении полисомы также разбираются, однако на каждой мРНК остаётся по одной-единственной 80S рибосоме [64, 70–72].

Помимо веществ, воздействующих на рибосому, мы взяли в нашу подборку также торин-1,

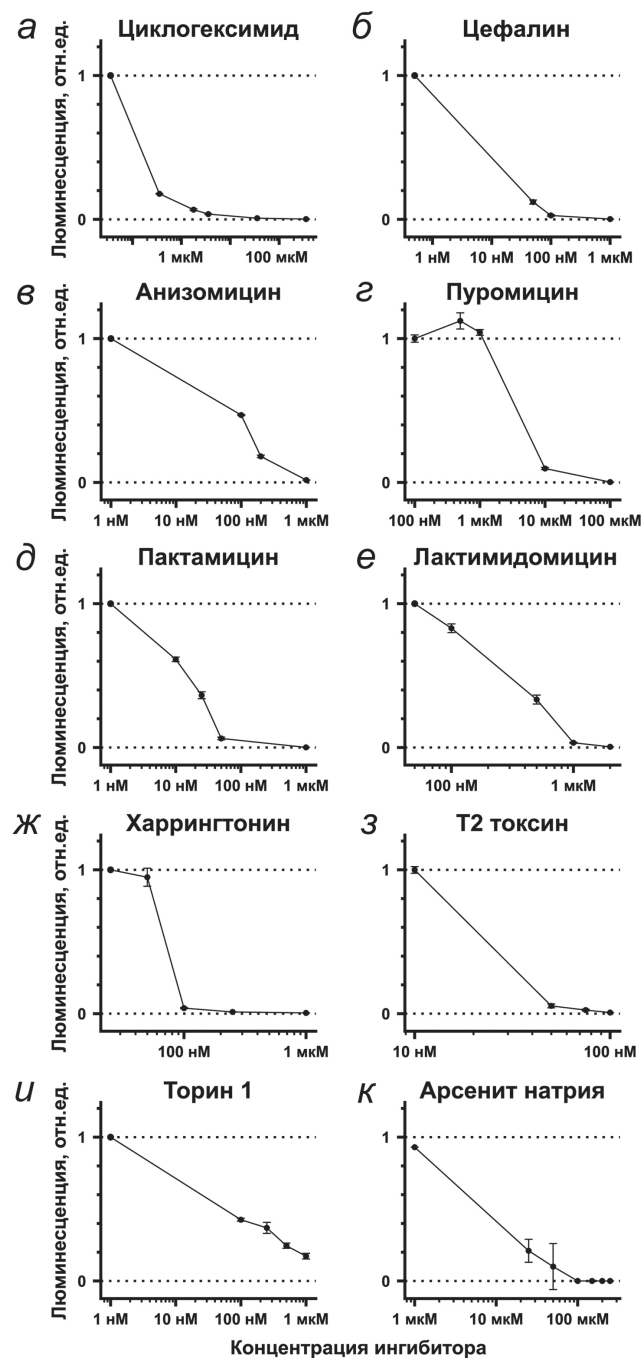
ингибитор протеинкиназы mTOR, воздействие которого приводит к инактивации кэп-связывающего аппарата клетки [73]. Снижение эффективности инициации трансляции высвобождает мРНК из полисом и, согласно вышеописанной модели, должно стимулировать сборку СГ. Однако ранее было показано, что вместо этого торин-1 незначительно ингибирует сборку СГ на двух разных моделях [61, 62], поэтому мы решили изучить его воздействие в нашей системе.

Для проведения экспериментов мы выбрали классическую модель, широко применяемую для изучения СГ в культивируемых клетках млекопитающих – жёсткий окислительный стресс, индуцируемый добавлением арсенита натрия ( $\text{NaH}_2\text{AsO}_3$ ), влияние которого на трансляцию хорошо изучено [9, 58, 60, 74–76]. Объект также использовали классический – клетки рака шейки матки человека линии HeLa.

**Анализ влияния низкомолекулярных ингибиторов на трансляцию в культивируемых клетках человека.** Эксперимент по определению влияния рибосомных ингибиторов на сборку СГ подразумевает полную остановку ими транслирующих рибосом, для чего их нужно добавить в заведомом избытке. Для определения нужных концентраций ингибиторов мы провели анализ подавления ими биосинтеза белка в нашей системе. Ингибирование клеточной трансляции удобно оценивать с помощью метода быстрой мРНК-трансфекции (англ. *fleeting mRNA transfection*, FLERT), разработанного нами ранее для изучения влияния стрессирующих воздействий [58, 77, 78] и низкомолекулярных ингибиторов синтеза белка [79, 80]. В качестве репортерной мРНК был взят экпированный полиаденилированный транскрипт, содержащий 5'-НТО мРНК  $\beta$ -актина человека, ген люциферазы светлячка и 3'-НТО мРНК вируса SV40, поскольку уровень трансляции такого транскрипта хорошо отражает работу типичных клеточных мРНК [57]. Для получения более достоверной картины мы использовали метод прижизненного мониторинга активности люциферазы в реальном времени [59, 79], а в качестве итогового результата брали значения через 10 ч после трансфекции, однако сходная картина подавления наблюдалась и в других временных точках (подробнее см. в разделе «Материалы и методы»).

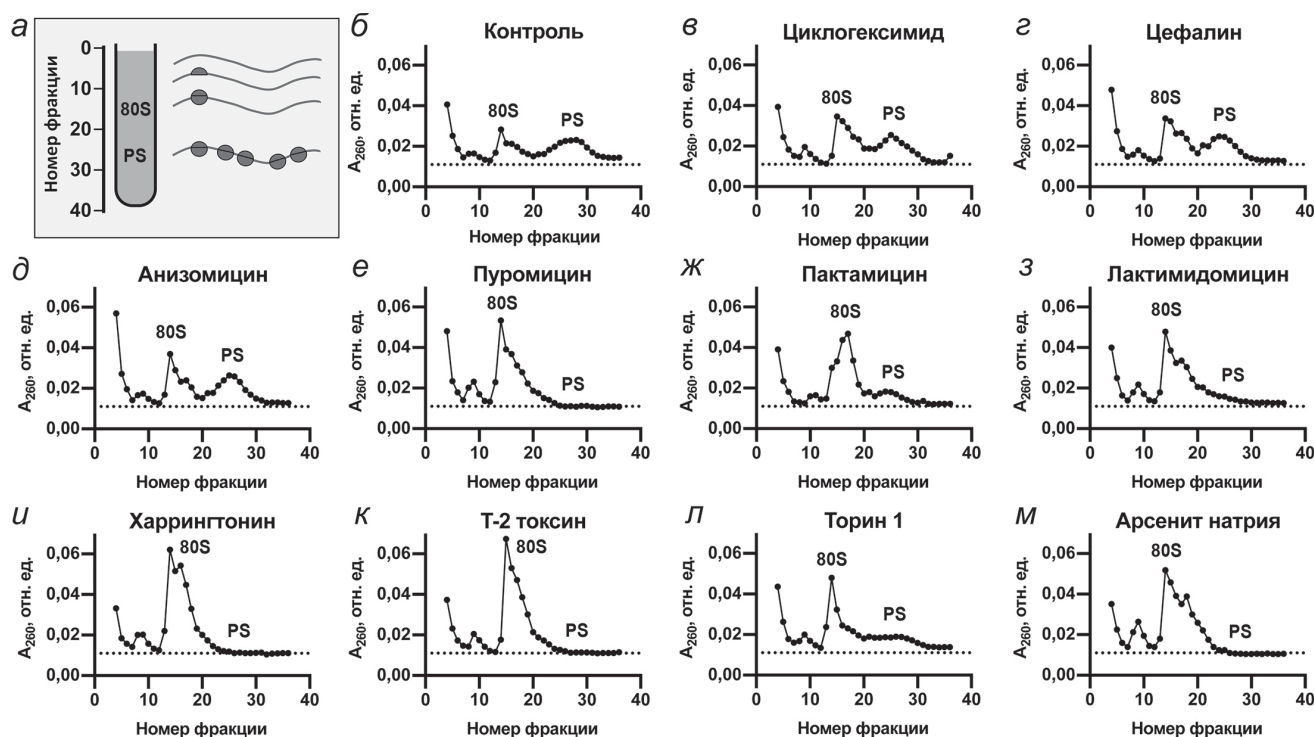
В соответствии с ожиданиями, при увеличении концентрации ингибиторов активность люциферазы, синтезированной в клетках, снижалась (рис. 1). Во всех случаях, кроме

торина-1, нам удалось достичь полного подавления трансляции трансфицированной мРНК. Результат, полученный с торин-1 (рис. 1, *и*),



**Рис. 1.** Анализ влияния избранных низкомолекулярных ингибиторов на трансляцию репортерной мРНК в клетках HeLa (*a–к*). Клетки трансфицировали экпированным полиаденилированным транскриптом, содержащим 5'-НТО мРНК  $\beta$ -актина человека, ген люциферазы светлячка и 3'-НТО мРНК вируса SV40. Перед трансфекцией к клеткам добавляли указанные вещества в разных концентрациях, активность люциферазы измеряли прижизненно в режиме реального времени, после чего брали значения в точке 10 ч (для арсенита натрия – 2 ч) после трансфекции





**Рис. 2.** Анализ полисомных профилей клеток HeLa, обработанных ингибиторами трансляции. *а* – Схема, иллюстрирующая распределение моносом и полисом во фракциях сахарозного градиента. *б* – Полисомный профиль клеток, не обработанных ингибиторами. *в–л* – То же, клетки в течение 30 мин обработаны избытком трансляционных ингибиторов: 350 мкМ циклогексимида, 10 мкМ цефалина, 10 мкМ анизомидина, 1 мМ пурамицина, 10 мкМ пактамицина, 10 мкМ лактимидомицина, 10 мкМ харрингтонина, 10 мкМ Т-2 токсина или 1 мкМ торина-1. *м* – Клетки в течение 1 ч обрабатывали 100 мкМ арсенитом натрия. «80S» – фракции, соответствующие моносомам, «PS» – полисомам

был ожидаемым, поскольку инактивация кэп-связывающего белка eIF4E не приводит к полному подавлению трансляции большинства мРНК в клетке, оказывая дифференциальное влияние на разные транскрипты [81, 82]. Для дальнейших экспериментов решено было взять концентрации ингибиторов, пятикратно превышающие минимальные концентрации, при которых наблюдалось полное подавление продукции люциферазы в данном опыте (а в случае торина-1 – максимальную испробованную).

В отдельном эксперименте мы провели анализ влияния арсенита натрия на трансляцию трансфицированной мРНК (рис. 1, *к*), чтобы иметь представление о степени подавления трансляции в условиях, используемых для анализа образования СГ. Арсенит добавляли за 1 ч до трансфекции, а значения, представленные на графике, в этом случае соответствуют точке 2 ч после трансфекции (поскольку в ходе многочасовой инкубации клетки приспособлялись к данному виду стресса и возобновляли трансляцию; данные не представлены).

**Анализ влияния низкомолекулярных ингибиторов на полисомы.** Чтобы оценить действие ингибиторов на общую клеточную трансля-

цию, а также убедиться, что на нашей модели эффекты их действия на полисомы не отличаются от описанных в литературе, мы проанализировали полисомный профиль в клетках HeLa, подвергнутых обработке ингибиторами в выбранных концентрациях на протяжении 30 мин (рис. 2). Как и ожидалось, обработка циклогексимидом, эметином и анизомидином приводила к накоплению тяжёлой фракции (т.е. к стабилизации полисом), в то время как пурамицин, пактамицин, лактимидомицин, харрингтонин, Т-2 токсин и торин-1 перераспределяли оптическую плотность в область моносом и верхних фракций (т.е. способствовали разборке полисом). В случае пактамицина и торина-1 полной разборки полисом не наблюдалось, однако клетки, обработанные пурамицином, лактимидомицином, харрингтонином и Т-2 токсином, демонстрировали очень сходное изменение полисомного профиля, указывающее на полное перетекание оптической плотности из области полисом в область моносом. При этом, как известно из литературы (см. обзор Dmitriev et al. [56]), в случае пурамицина фракция моносом представляет собой в основном «пустые» 80S рибосомы (не содержащие мРНК), в то время как



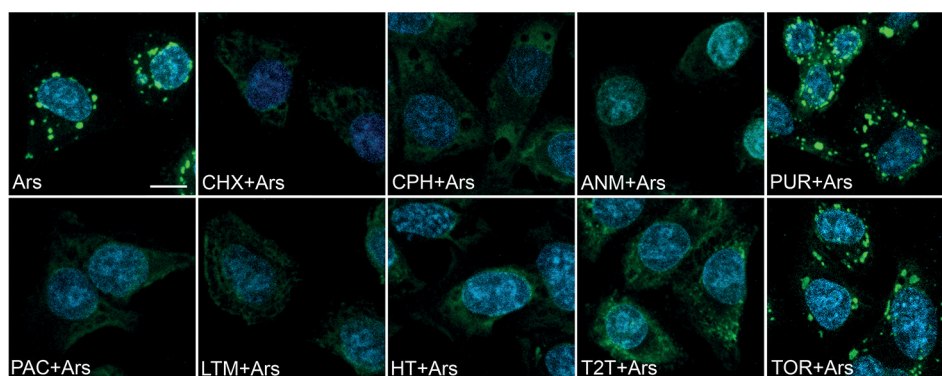
в случае лактимидомицина, харрингтонины, T-2 токсина и пактамицина пик моносом в основном должен соответствовать единичным 80S рибосомам, заблокированным в области старта [56, 65, 69, 83, 84]. Таким образом, нам удалось подобрать условия, при которых в клетке накапливаются мРНК с протяжёнными участками, освобождёнными от рибосом, но несущие на себе по одной-единственной 80S рибосоме.

**Влияние рибосомных ингибиторов на сборку стресс-гранул при арсенидном стрессе.** Подобранным образом нужные нам условия и убедившись в том, что действие ингибиторов соответствует ожидаемому, мы перешли к анализу их влияния на сборку СГ. Как уже было сказано выше, классическим индуктором образования СГ в культивируемых клетках млекопитающих является арсенит натрия, который вызывает жёсткий окислительный стресс [9, 74–76]. Клетки HeLa выдерживали в течение 30 мин с ингибиторами трансляции, добавленными в тех же самых концентрациях, которые до этого использовали в опыте по анализу полисомного профиля, а затем добавляли 100 мкМ арсенита и инкубировали ещё 1 ч, после чего клетки фиксировали и проводили окраску (рис. 3). Для визуализации СГ использовали антитела к белку G3BP1, классическому маркеру этих органелл.

Как и ожидалось, в отсутствие рибосомных ингибиторов арсенидный стресс приводил к появлению в клетках микроскопически различных СГ. Аналогичные гранулы также обнаруживались в клетках, преинкубированных с пуромицином, но отсутствовали в слу-

чае добавления циклогексимида, цефалина и анизомицина, что полностью согласуется с ранее описанными эффектами, оказанными этими ингибиторами на сборку СГ [14, 37–39, 51, 54, 55]. Пактамицин воспрепятствовал сборке, что, однако, сложно интерпретировать из-за его двоякого действия на полисомы в нашей модели (рис. 2, ж). Обработка же торинном-1 не помешала сборке СГ, что в целом соответствует более ранним наблюдениям [61, 62]. И хотя этот результат не слишком хорошо соотносится с вышеописанной моделью сборки СГ (см. Введение), в которой одну из ключевых ролей играют освобожденные от рибосом протяжённые участки мРНК – ведь их количество при частичной разборке полисом должно очевидным образом увеличиваться, его можно объяснить либо неполной разборкой полисом (рис. 2, л), либо важной ролью взаимодействия eIF4E с eIF4G в образовании СГ [61].

Наконец, в клетках, преинкубированных с лактимидомицином, харрингтонином и T-2 токсином (также приводящими к разборке полисом, однако оставляющими на мРНК одну 80S рибосому в начале кодирующей части), арсенит не вызывал появления СГ. Эти данные свидетельствуют о том, что в условиях, когда большинство мРНК в клетке вышли из полисом, но несут по одной 80S рибосоме, образование СГ становится невозможным. Наиболее простым объяснением этого факта является то, что такие мРНК-моносомные комплексы не способны входить в состав СГ и поэтому не могут участвовать в LLPS-опосредованной конденсации, несмотря на наличие протяжённых участков, свободных от рибосом.



**Рис. 3.** Анализ влияния трансляционных ингибиторов на формирование стресс-гранул, индуцированное арсенидом натрия. Представлены конфокальные микрофотографии клеток HeLa, подвергнутых последовательной обработке указанными рибосомными ингибиторами (CHX – 350 мкМ циклогексимида, CPH – 10 мкМ цефалина, ANM – 10 мкМ анизомицина, PUR – 1 мМ пуромицина, PAC – 10 мкМ пактамицина, LTM – 10 мкМ лактимидомицина, HT – 10 мкМ харрингтонины, T2T – 10 мкМ T-2 токсина, TOR – 1 мкМ торина-1) на протяжении 30 мин и 100 мкМ арсенидом натрия (Ars) в течение 60 мин. Клетки фиксированы и окрашены антителами к G3BP1 (маркер СГ, зелёный канал) и красителем Hoechst 33342 (ядра, синий канал). Представлено репрезентативное поле из нескольких десятков проанализированных полей. Все фотографии сделаны при одинаковом увеличении (масштаб линейки – 10 мкм) и мощности возбуждающего лазера, для каждой панели представлена сумма всех кадров соответствующей Z-стопки

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитоплазматические РНК-белковые конденсаты (СГ, Р-тельца, герминальные гранулы, нейрональные гранулы и прочие РНП-содержащие немембранные компартменты) играют важную роль в РНК-метаболизме эукариотических клеток [3, 5, 7, 85]. Физико-химические принципы, лежащие в основе их формирования, связаны с LLPS [21, 22, 24–26, 28–30], однако молекулярные механизмы, обеспечивающие их сборку, изучены недостаточно.

Принято считать, что в случае СГ триггером LLPS служат определённые модификации РНК-связывающих белков (например, G3BP1/2) вкупе с появлением в клетке протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом [27, 31, 33, 34]. Агрегация этих участков РНК может приводить к образованию СГ аналогично тому, как частично денатурированные белки, накапливающиеся в клетке при тепловом шоке, образуют белковые агрегаты [86] – при этом рибосомы, РНК-хеликазы и некоторые РНК-связывающие белки выполняют роль РНК-шаперонов, регулирующих РНК-РНК-взаимодействия. В условиях резкого увеличения доступных для спаривания участков мРНК (что наблюдается при массивном выходе мРНК из полисом) этот аппарат перестаёт справляться с нагрузкой подобно тому, как белковых шаперонов становится недостаточно для поддержания протеостаза при тепловом шоке [86].

В полном соответствии с этой моделью классические рибосомные ингибиторы, которые блокируют элонгацию и стабилизируют полисомы – циклогексимид, эметин и анизомицин – предотвращают сборку СГ, в то время как полная разборка полисом под действием индуктора преждевременной терминации, пурамицина, наоборот, ей способствует или даже провоцирует образование СГ [10, 14, 37–39, 51, 55]. Здесь мы ещё раз подтвердили эти факты.

Однако в данной работе мы впервые проанализировали влияние на формирование СГ ингибиторов элонгации другого типа – лактимидомицина, харрингтонина и Т-2 токсина. Их мишенью также является рибосома (Е-сайт или пептидилтрансферазный центр 60S субчастицы, как и, например, в случае циклогексимиды или анизомицина), однако в силу некоторых структурных особенностей [68] они не способны конкурировать с тРНК на активно транслирующих рибосомах, поэтому связываются только с вакантными субчастицами. В результате на каждой мРНК они блокируют единственную 80S рибосому, только что приступившую к элонгации, останавливая её в

самом начале кодирующей части (подробно рассмотрено в обзоре Dmitriev et al. [56]). Остальные рибосомы при этом продолжают элонгацию, благополучно терминируют и в итоге покидают мРНК. В случае харрингтонина и лактимидомицина это их свойство используется для картирования стартов трансляции методом рибосомного профайлинга [69, 83, 84]. Однако нас они заинтересовали потому, что в клетках, обработанных рибосомными ингибиторами этого типа, мРНК, с одной стороны, имеют освобождённые от рибосом протяжённые участки (как и после обработки клеток пурамицином), но с другой – на них находятся одиночные рибосомы, остановленные в начале кодирующих частей. Казалось бы, разборка полисом и появление таких «обнажённых» участков должны способствовать образованию СГ. Однако вместо этого мы обнаружили ингибирование их сборки. Таким образом, мы показали, что разборка полисом сама по себе не всегда способствует сборке СГ. Более того, наши данные позволяют предположить, что если на мРНК остаётся хотя бы одна 80S рибосома, даже когда вся остальная кодирующая часть освобождена от рибосом, вовлечение этой мРНК в СГ становится невозможным.

Мы не смогли найти иных объяснений нашему наблюдению. Поскольку все процедуры с клетками, обработанными разными ингибиторами, проводили по одинаковому протоколу, речь едва ли может идти об артефакте фиксации клеток. На всякий случай мы повторили наш эксперимент с некоторыми из ингибиторов в прижизненном формате (используя для визуализации другой маркер СГ – фьюжн-белок PABP–mCherry, данные не представлены) и получили такие же результаты. Используемые нами вещества были коммерческими препаратами сходной степени чистоты и оказывали ингибирующее действие на трансляцию, соответствующее ожидаемому, поэтому неспецифичные эффекты «неканонических» ингибиторов весьма маловероятны. Кроме того, одновременное добавление комбинации «классических» ингибиторов, пурамицина и циклогексимиды, которая, согласно данным рибосомного профайлинга [87], также приводит к избирательному накоплению единичных рибосом на стартовом кодоне, оказывала такое же воздействие, как и добавление лактимидомицина, харрингтонина или Т-2 токсина (данные не представлены). Принимая во внимание все эти факты, мы считаем наше предположение о невозможности вовлечения мРНК с находящейся на ней единственной 80S рибосомой в СГ наиболее правдоподобным.

Этот результат особенно интересен в контексте хорошо задокументированных наблюдений об индукции образования СГ веществами, которые вызывают арест сканирующих 43S рибосомных комплексов на 5'-НТО мРНК, блокируя работу РНК-хеликазы eIF4A, – патеамином А, гиппуристанолом и рокаглатами типа силвестрола [47–50]. Аналогичный эффект был описан также для эдеина [88], который приводит к накоплению 40S субчастиц на мРНК (однако следует заметить, что в норме это вещество не способно проникать в клетки [89] – в соответствии с чем в наших руках эдеин не оказывал ингибирующего действия на трансляцию в клетках, данные не представлены). Кроме того, ингибирование присоединения 60S субчастиц к 48S преинициаторному комплексу ещё одним веществом, МДМР, хотя и не индуцировало образование СГ, но и не влияло на их сборку [51]. Таким образом, наличие малых субчастиц рибосом на мРНК не препятствует их попаданию в СГ.

Объяснений того, почему наличие даже одной 80S рибосомы на мРНК препятствует её вовлечению в СГ, может быть несколько. Это может быть связано со свойствами 60S рибосомных субчастиц, которые могут активно исключаться из СГ, либо с белками, которые узнают остановленные 80S рибосомы [90] и препятствуют вхождению таких комплексов в СГ. Нельзя также исключать, что структура мРНК в состоянии, связанном с 80S рибосомами, но не с 40S субчастицами, топологически не способствует образованию РНК-РНК-взаимодействий и вовлечению мРНК в конденсаты (например, известно, что транслируемые мРНК имеют особую топологию как в структурном, так и в функциональном плане – см. обсуждение в работах Alekhina et al. и Baumukhametov et al. [91, 92] и ссылки в них). Наконец, пожалуй, самый интересный вариант объяснения наших результатов заключается в том, что вовлечение мРНК в СГ может требовать прямого контакта РНК-связывающих белков с межсубъединичным интерфейсом или другими областями 40S субчастицы, находящейся на мРНК, которые недоступны в случае ассоциированных субчастиц. Таким

белком может быть G3BP1/2, ключевой компонент СГ, для которого ранее было показано прямое связывание с 40S субчастицей рибосомы [93, 94].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наши данные позволяют сделать вывод, что для формирования стресс-гранул недостаточно появления в клетке большого количества протяжённых участков мРНК, свободных от рибосом, но требуется также освобождение как минимум части транскриптов от рибосомных 60S субчастиц. Это может быть связано с необходимостью ассоциации РНК-связывающих белков, необходимых для вовлечения мРНК в стресс-гранулы, с теми областями находящейся на мРНК 40S субчастицы, которые недоступны в 80S рибосоме.

**Вклад авторов.** А.Г. Федоровский, А.В. Бураков, И.М. Теренин, Д.А. Быков, К.А. Лашкевич, В.И. Попенко, Н.Е. Макарова, И.И. Сорокин – постановка экспериментов; Д.А. Быков и С.Е. Дмитриев – концепция исследования; И.М. Теренин, П.В. Иванов, С.Е. Дмитриев – обсуждение результатов; В.С. Прасолов, С.Е. Дмитриев – предоставление инфраструктуры и руководство проектом; А.Г. Федоровский, А.В. Бураков, И.М. Теренин, А.П. Сухина, С.Е. Дмитриев – подготовка иллюстраций, написание, редактирование и перевод статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-14-00291).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Евгении А. Пановой (ФББ МГУ) за препарат мРНК Actin-Fluc. В работе использован конфокальный микроскоп Zeiss LSM900, приобретённый по Программе развития МГУ.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhattar, N., Dmitriev, S. E., and Ivanov, P. (2023) Cell death or survival: Insights into the role of mRNA translational control, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **154**, 138–154, doi: 10.1016/j.semcdb.2023.06.006.
2. Guzikowski, A. R., Chen, Y. S., and Zid, B. M. (2019) Stress-induced mRNP granules: Form and function of processing bodies and stress granules, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **10**, e1524, doi: 10.1002/wrna.1524.



3. Ivanov, P., Kedersha, N., and Anderson, P. (2019) Stress granules and processing bodies in translational control, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **11**, a032813, doi: 10.1101/cshperspect.a032813.
4. Protter, D. S., and Parker, R. (2016) Principles and properties of stress granules, *Trends Cell Biol.*, **26**, 668-679, doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.004.
5. Riggs, C. L., Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2020) Mammalian stress granules and P bodies at a glance, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs242487, doi: 10.1242/jcs.242487.
6. Anderson, P., and Kedersha, N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage, *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 141-150, doi: 10.1016/j.tibs.2007.12.003.
7. Lashkevich, K. A., and Dmitriev, S. E. (2021) mRNA targeting, transport and local translation in eukaryotic cells: from the classical view to a diversity of new concepts, *Mol. Biol.*, **55**, 507-537, doi: 10.1134/S0026893321030080.
8. Sorokin, I. I., Vassilenko, K. S., Terenin, I. M., Kalinina, N. O., Agol, V. I., and Dmitriev, S. E. (2021) Non-canonical translation initiation mechanisms employed by eukaryotic viral mRNAs, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1060-1094, doi: 10.1134/S0006297921090042.
9. Kedersha, N., Chen, S., Gilks, N., Li, W., Miller, I. J., Stahl, J., and Anderson, P. (2002) Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules, *Mol. Biol. Cell*, **13**, 195-210, doi: 10.1091/mbc.01-05-0221.
10. Makeeva, D. S., Riggs, C. L., Burakov, A. V., Ivanov, P. A., Kushchenko, A. S., Bykov, D. A., Popenko, V. I., Prassolov, V. S., Ivanov, P. V., and Dmitriev, S. E. (2023) Relocalization of translation termination and ribosome recycling factors to stress granules coincides with elevated stop-codon readthrough and reinitiation rates upon oxidative stress, *Cells*, **12**, 259, doi: 10.3390/cells12020259.
11. Harvey, R., Dezi, V., Pizzinga, M., and Willis, A. E. (2017) Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 1007-1014, doi: 10.1042/BST20160364.
12. Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., and Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules, *J. Cell Biol.*, **147**, 1431-1442, doi: 10.1083/jcb.147.7.1431.
13. Matsuki, H., Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G. N., Oie, M., and Fujii, M. (2013) Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation, *Genes Cells*, **18**, 135-146, doi: 10.1111/gtc.12023.
14. Mazroui, R., Huot, M. E., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y., and Khandjian, E. W. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression, *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 3007-3017.
15. Kedersha, N., Ivanov, P., and Anderson, P. (2013) Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.*, **38**, 494-506, doi: 10.1016/j.tibs.2013.07.004.
16. Jain, S., Wheeler, J. R., Walters, R. W., Agrawal, A., Barsic, A., and Parker, R. (2016) ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure, *Cell*, **164**, 487-498, doi: 10.1016/j.cell.2015.12.038.
17. Youn, J. Y., Dunham, W. H., Hong, S. J., Knight, J. D. R., Bashkurov, M., Chen, G. I., Bagci, H., Rathod, B., MacLeod, G., Eng, S. W. M., Angers, S., Morris, Q., Fabian, M., Cote, J. F., and Gingras, A. C. (2018) High-density proximity mapping reveals the subcellular organization of mRNA-associated granules and bodies, *Mol. Cell*, **69**, 517-532.e511, doi: 10.1016/j.molcel.2017.12.020.
18. Markmiller, S., Soltanieh, S., Server, K. L., Mak, R., Jin, W., Fang, M. Y., Luo, E. C., Krach, F., Yang, D., Sen, A., Fulzele, A., Wozniak, J. M., Gonzalez, D. J., Kankel, M. W., Gao, F. B., Bennett, E. J., Lecuyer, E., and Yeo, G. W. (2018) Context-dependent and disease-specific diversity in protein interactions within stress granules, *Cell*, **172**, 590-604.e513, doi: 10.1016/j.cell.2017.12.032.
19. Youn, J. Y., Dyakov, B. J. A., Zhang, J., Knight, J. D. R., Vernon, R. M., Forman-Kay, J. D., and Gingras, A. C. (2019) Properties of stress granule and P-body proteomes, *Mol. Cell*, **76**, 286-294, doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.014.
20. Marmor-Kollet, H., Siany, A., Kedersha, N., Knafo, N., Rivkin, N., Danino, Y. M., Moens, T. G., Olender, T., Sheban, D., Cohen, N., Dadoosh, T., Addadi, Y., Ravid, R., Eitan, C., Toth Cohen, B., Hofmann, S., Riggs, C. L., Advani, V. M., Higginbottom, A., Cooper-Knock, J., et al. (2020) Spatiotemporal proteomic analysis of stress granule disassembly using APEX reveals regulation by SUMOylation and links to ALS pathogenesis, *Mol. Cell*, **80**, 876-891.e876, doi: 10.1016/j.molcel.2020.10.032.
21. Banani, S. F., Lee, H. O., Hyman, A. A., and Rosen, M. K. (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285-298, doi: 10.1038/nrm.2017.7.
22. Jain, A., and Vale, R. D. (2017) RNA phase transitions in repeat expansion disorders, *Nature*, **546**, 243-247, doi: 10.1038/nature22386.
23. Alberti, S., Gladfelter, A., and Mittag, T. (2019) Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates, *Cell*, **176**, 419-434, doi: 10.1016/j.cell.2018.12.035.
24. Shin, Y., and Brangwynne, C. P. (2017) Liquid phase condensation in cell physiology and disease, *Science*, **357**, doi: 10.1126/science.aaf4382.



25. Zhang, H., Elbaum-Garfinkle, S., Langdon, E. M., Taylor, N., Occhipinti, P., Bridges, A. A., Brangwynne, C. P., and Gladfelter, A. S. (2015) RNA controls PolyQ protein phase transitions, *Mol. Cell*, **60**, 220-230, doi: 10.1016/j.molcel.2015.09.017.
26. Langdon, E. M., Qiu, Y., Ghanbari Niaki, A., McLaughlin, G. A., Weidmann, C. A., Gerbich, T. M., Smith, J. A., Crutchley, J. M., Termini, C. M., Weeks, K. M., Myong, S., and Gladfelter, A. S. (2018) mRNA structure determines specificity of a polyQ-driven phase separation, *Science*, **360**, 922-927, doi: 10.1126/science.aar7432.
27. Van Treeck, B., and Parker, R. (2018) Emerging roles for intermolecular RNA-RNA interactions in RNP assemblies, *Cell*, **174**, 791-802, doi: 10.1016/j.cell.2018.07.023.
28. Kroschwald, S., Maharana, S., Mateju, D., Malinowska, L., Nuske, E., Poser, I., Richter, D., and Alberti, S. (2015) Promiscuous interactions and protein disaggregases determine the material state of stress-inducible RNP granules, *eLife*, **4**, e06807, doi: 10.7554/eLife.06807.
29. Mollieux, A., Temirov, J., Lee, J., Coughlin, M., Kanagaraj, A. P., Kim, H. J., Mittag, T., and Taylor, J. P. (2015) Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization, *Cell*, **163**, 123-133, doi: 10.1016/j.cell.2015.09.015.
30. Patel, A., Lee, H. O., Jawerth, L., Maharana, S., Jahnelt, M., Hein, M. Y., Stoyanov, S., Mahamid, J., Saha, S., Franzmann, T. M., Pozniakovski, A., Poser, I., Maghelli, N., Royer, L. A., Weigert, M., Myers, E. W., Grill, S., Drechsel, D., Hyman, A. A., and Alberti, S. (2015) A liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation, *Cell*, **162**, 1066-1077, doi: 10.1016/j.cell.2015.07.047.
31. Van Treeck, B., Protter, D. S. W., Matheny, T., Khong, A., Link, C. D., and Parker, R. (2018) RNA self-assembly contributes to stress granule formation and defining the stress granule transcriptome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 2734-2739, doi: 10.1073/pnas.1800038115.
32. Panas, M. D., Ivanov, P., and Anderson, P. (2016) Mechanistic insights into mammalian stress granule dynamics, *J. Cell Biol.*, **215**, 313-323, doi: 10.1083/jcb.201609081.
33. Guillen-Boixet, J., Kopach, A., Holehouse, A. S., Wittmann, S., Jahnelt, M., Schlusser, R., Kim, K., Trussina, I., Wang, J., Mateju, D., Poser, I., Maharana, S., Ruer-Gruss, M., Richter, D., Zhang, X., Chang, Y. T., Guck, J., Honigsmann, A., Mahamid, J., Hyman, A. A., et al. (2020) RNA-induced conformational switching and clustering of G3BP drive stress granule assembly by condensation, *Cell*, **181**, 346-361. e317, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.049.
34. Yang, P., Mathieu, C., Kolaitis, R. M., Zhang, P., Messing, J., Yurtsever, U., Yang, Z., Wu, J., Li, Y., Pan, Q., Yu, J., Martin, E. W., Mittag, T., Kim, H. J., and Taylor, J. P. (2020) G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules, *Cell*, **181**, 325-345. e328, doi: 10.1016/j.cell.2020.03.046.
35. Khong, A., Matheny, T., Jain, S., Mitchell, S. F., Wheeler, J. R., and Parker, R. (2017) The stress granule transcriptome reveals principles of mRNA accumulation in stress granules, *Mol. Cell*, **68**, 808-820. e805, doi: 10.1016/j.molcel.2017.10.015.
36. Namkoong, S., Ho, A., Woo, Y. M., Kwak, H., and Lee, J. H. (2018) Systematic characterization of stress-induced RNA granulation, *Mol. Cell*, **70**, 175-187. e178, doi: 10.1016/j.molcel.2018.02.025.
37. Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., and Anderson, P. (2000) Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules, *J. Cell Biol.*, **151**, 1257-1268, doi: 10.1083/jcb.151.6.1257.
38. Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., and Weil, D. (2008) Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress, *Mol. Biol. Cell*, **19**, 4469-4479, doi: 10.1091/mbc.e08-05-0499.
39. Brengues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies, *Science*, **310**, 486-489, doi: 10.1126/science.1115791.
40. Kedersha, N., and Anderson, P. (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability, *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 963-969, doi: 10.1042/bst0300963.
41. Reineke, L. C., Dougherty, J. D., Pierre, P., and Lloyd, R. E. (2012) Large G3BP-induced granules trigger eIF2 $\alpha$  phosphorylation, *Mol. Biol. Cell*, **23**, 3499-3510, doi: 10.1091/mbc.E12-05-0385.
42. Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Ron, D., Jefferson, L. S., and Harding, H. P. (2003) Mammalian stress granules represent sites of accumulation of stalled translation initiation complexes, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **284**, C273-C284, doi: 10.1152/ajpcell.00314.2002.
43. Souquere, S., Mollet, S., Kress, M., Dautry, F., Pierron, G., and Weil, D. (2009) Unravelling the ultrastructure of stress granules and associated P-bodies in human cells, *J. Cell Sci.*, **122**, 3619-3626, doi: 10.1242/jcs.054437.
44. Moon, S. L., Morisaki, T., Khong, A., Lyon, K., Parker, R., and Stasevich, T. J. (2019) Multicolour single-molecule tracking of mRNA interactions with RNP granules, *Nat. Cell Biol.*, **21**, 162-168, doi: 10.1038/s41556-018-0263-4.
45. Mateju, D., Eichenberger, B., Voigt, F., Eglinger, J., Roth, G., and Chao, J. A. (2020) Single-molecule imaging reveals translation of mRNAs localized to stress granules, *Cell*, **183**, 1801-1812. e1813, doi: 10.1016/j.cell.2020.11.010.

46. Seguin, S. J., Morelli, F. F., Vinet, J., Amore, D., De Biasi, S., Poletti, A., Rubinsztein, D. C., and Carra, S. (2014) Inhibition of autophagy, lysosome and VCP function impairs stress granule assembly, *Cell Death Differ.*, **21**, 1838-1851, doi: 10.1038/cdd.2014.103.
47. Dang, Y., Kedersha, N., Low, W. K., Romo, D., Gorospe, M., Kaufman, R., Anderson, P., and Liu, J. O. (2006) Eukaryotic initiation factor 2alpha-independent pathway of stress granule induction by the natural product pateamine A, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32870-32878, doi: 10.1074/jbc.M606149200.
48. Mazroui, R., Sukarieh, R., Bordeleau, M. E., Kaufman, R. J., Northcote, P., Tanaka, J., Gallouzi, I., and Pelletier, J. (2006) Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation, *Mol. Biol. Cell*, **17**, 4212-4219, doi: 10.1091/mbc.e06-04-0318.
49. Cencic, R., Carrier, M., Galicia-Vazquez, G., Bordeleau, M. E., Sukarieh, R., Bourdeau, A., Brem, B., Teodoro, J. G., Greger, H., Tremblay, M. L., Porco, J. A., Jr., and Pelletier, J. (2009) Antitumor activity and mechanism of action of the cyclopenta[*b*]benzofuran, silvestrol, *PLoS One*, **4**, e5223, doi: 10.1371/journal.pone.0005223.
50. Low, W. K., Dang, Y., Schneider-Poetsch, T., Shi, Z., Choi, N. S., Merrick, W. C., Romo, D., and Liu, J. O. (2005) Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A, *Mol. Cell*, **20**, 709-722, doi: 10.1016/j.molcel.2005.10.008.
51. Mokaš, S., Mills, J. R., Garreau, C., Fournier, M. J., Robert, F., Arya, P., Kaufman, R. J., Pelletier, J., and Mazroui, R. (2009) Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition, *Mol. Biol. Cell*, **20**, 2673-2683, doi: 10.1091/mbc.e08-10-1061.
52. Emara, M. M., Ivanov, P., Hickman, T., Dawra, N., Tisdale, S., Kedersha, N., Hu, G. F., and Anderson, P. (2010) Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly, *J. Biol. Chem.*, **285**, 10959-10968, doi: 10.1074/jbc.M109.077560.
53. Fujimura, K., Sasaki, A. T., and Anderson, P. (2012) Selenite targets eIF4E-binding protein-1 to inhibit translation initiation and induce the assembly of non-canonical stress granules, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 8099-8110, doi: 10.1093/nar/gks566.
54. Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., and Irie, K. (2009) hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions, *Genes Cells*, **14**, 113-128, doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01256.x.
55. Samir, P., Kesavardhana, S., Patmore, D. M., Gingras, S., Malireddi, R. K. S., Karki, R., Guy, C. S., Briard, B., Place, D. E., Bhattacharya, A., Sharma, B. R., Nourse, A., King, S. V., Pitre, A., Burton, A. R., Pelletier, S., Gilbertson, R. J., and Kanneganti, T. D. (2019) DDX3X acts as a live-or-die checkpoint in stressed cells by regulating NLRP3 inflammasome, *Nature*, **573**, 590-594, doi: 10.1038/s41586-019-1551-2.
56. Dmitriev, S. E., Vladimirov, D. O., and Lashkevich, K. A. (2020) A quick guide to small-molecule inhibitors of eukaryotic protein synthesis, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1389-1421, doi: 10.1134/S0006297920110097.
57. Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., Adyanova, Z. V., Terenin, I. M., and Shatsky, I. N. (2009) Efficient cap-dependent translation of mammalian mRNAs with long and highly structured 5'-untranslated regions *in vitro* and *in vivo*, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **43**, 108-113, doi: 10.1134/S0026893309010154.
58. Akulich, K. A., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Anisimova, A. S., Makeeva, D. S., Arkhipova, V. I., Stolboushkina, E. A., Garber, M. B., Prokofjeva, M. M., Spirin, P. V., Prassolov, V. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2016) Four translation initiation pathways employed by the leaderless mRNA in eukaryotes, *Sci. Rep.*, **6**, 37905, doi: 10.1038/srep37905.
59. Panova, E. A., Kleymenov, D. A., Shcheblyakov, D. V., Bykonja, E. N., Mazunina, E. P., Dzharullaeva, A. S., Zolotar, A. N., Derkaev, A. A., Esmagambetov, I. B., Sorokin, I. I., Usachev, E. V., Noskov, A. N., Ivanov, I. A., Zatsepin, T. S., Dmitriev, S. E., Gushchin, V. A., Naroditsky, B. S., Logunov, D. Y., and Gintsburg, A. L. (2023) Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A, *Front. Immunol.*, **14**, 1098302, doi: 10.3389/fimmu.2023.1098302.
60. Andreev, D. E., O'Connor, P. B., Fahey, C., Kenny, E. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Cormican, P., Morris, D. W., Shatsky, I. N., and Baranov, P. V. (2015) Translation of 5' leaders is pervasive in genes resistant to eIF2 repression, *eLife*, **4**, e03971, doi: 10.7554/eLife.03971.
61. Fournier, M. J., Coudert, L., Mellaoui, S., Adjibade, P., Gareau, C., Cote, M. F., Sonenberg, N., Gaudreault, R. C., and Mazroui, R. (2013) Inactivation of the mTORC1-eukaryotic translation initiation factor 4E pathway alters stress granule formation, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 2285-2301, doi: 10.1128/MCB.01517-12.
62. Ying, S., and Khapersky, D. A. (2020) UV damage induces G3BP1-dependent stress granule formation that is not driven by mTOR inhibition-mediated translation arrest, *J. Cell Sci.*, **133**, jcs248310, doi: 10.1242/jcs.248310.
63. Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., and Bolton, E. E. (2023) PubChem 2023 update, *Nucleic Acids Res.*, **51**, D1373-D1380, doi: 10.1093/nar/gkac956.
64. Tscherne, J. S., and Pestka, S. (1975) Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **8**, 479-487, doi: 10.1128/AAC.8.4.479.

65. Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., Lomakin, I. B., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Smirnova, V. V., Mironov, A. A., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2017) Peptidyl transferase inhibitors arrest the ribosome at specific amino acid codons: insights from an integrated approach, *FEBS J.*, **284**, 104-392, doi: 10.1111/febs.14174.
66. Dinos, G., Wilson, D. N., Teraoka, Y., Szaflarski, W., Fucini, P., Kalpaxis, D., and Nierhaus, K. H. (2004) Dissecting the ribosomal inhibition mechanisms of edeine and pactamycin: the universally conserved residues G693 and C795 regulate P-site RNA binding, *Mol. Cell*, **13**, 113-124, doi: 10.1016/s1097-2765(04)00002-4.
67. Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D. E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W. C., Green, R., Shen, B., and Liu, J. O. (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin, *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 209-217, doi: 10.1038/nchembio.304.
68. Garreau de Loubresse, N., Prokhorova, I., Holtkamp, W., Rodnina, M. V., Yusupova, G., and Yusupov, M. (2014) Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome, *Nature*, **513**, 517-522, doi: 10.1038/nature13737.
69. Lee, S., Liu, B., Lee, S., Huang, S. X., Shen, B., and Qian, S. B. (2012) Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, E2424-E2432, doi: 10.1073/pnas.1207846109.
70. Fresno, M., Jimenez, A., and Vazquez, D. (1977) Inhibition of translation in eukaryotic systems by harringtonine, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 323-330, doi: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11256.x.
71. Cundliffe, E., Cannon, M., and Davies, J. (1974) Mechanism of inhibition of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 30-34, doi: 10.1073/pnas.71.1.30.
72. Cannon, M., Smith, K. E., and Carter, C. J. (1976) Prevention, by ribosome-bound nascent polypeptidyl chains, of the functional interaction of t-2 toxin with its receptor site, *Biochem. J.*, **156**, 289-294, doi: 10.1042/bj1560289.
73. Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M., and Gray, N. S. (2009) An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1, *J. Biol. Chem.*, **284**, 8023-8032, doi: 10.1074/jbc.M900301200.
74. Brostrom, C. O., Prostko, C. R., Kaufman, R. J., and Brostrom, M. A. (1996) Inhibition of translational initiation by activators of the glucose-regulated stress protein and heat shock protein stress response systems. Role of the interferon-inducible double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase, *J. Biol. Chem.*, **271**, 24995-25002, doi: 10.1074/jbc.271.40.24995.
75. Bernstam, L., and Nriagu, J. (2000) Molecular aspects of arsenic stress, *J. Toxicol. Environ. Health. Part B Crit. Rev.*, **3**, 293-322, doi: 10.1080/109374000436355.
76. Ruiz-Ramos, R., Lopez-Carrillo, L., Rios-Perez, A. D., De Vizcaya-Ruiz, A., and Cebrian, M. E. (2009) Sodium arsenite induces ROS generation, DNA oxidative damage, HO-1 and c-Myc proteins, NF-kappaB activation and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells, *Mutat. Res.*, **674**, 109-115, doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.09.021.
77. Akulich, K. A., Sinitcyn, P. G., Makeeva, D. S., Andreev, D. E., Terenin, I. M., Anisimova, A. S., Shatsky, I. N., and Dmitriev, S. E. (2019) A novel uORF-based regulatory mechanism controls translation of the human MDM2 and eIF2D mRNAs during stress, *Biochimie*, **157**, 92-101, doi: 10.1016/j.biochi.2018.11.005.
78. Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., Andreev, D. E., and Shatsky, I. N. (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 836-841, doi: 10.1038/nsmb.1445.
79. Osterman, I. A., Wieland, M., Maviza, T. P., Lashkevich, K. A., Lukianov, D. A., Komarova, E. S., Zakalyukina, Y. V., Buschauer, R., Shiriaev, D. I., Leyn, S. A., Zlamal, J. E., Biryukov, M. V., Skvortsov, D. A., Tashlitsky, V. N., Polshakov, V. I., Cheng, J., Polikanov, Y. S., Bogdanov, A. A., Osterman, A. L., Dmitriev, S. E., et al. (2020) Tetracenomycin X inhibits translation by binding within the ribosomal exit tunnel, *Nat. Chem. Biol.*, **16**, 1071-1077, doi: 10.1038/s41589-020-0578-x.
80. Prokhorova, I. V., Akulich, K. A., Makeeva, D. S., Osterman, I. A., Skvortsov, D. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Yusupova, G., Yusupov, M. M., and Dmitriev, S. E. (2016) Amicoumacin A induces cancer cell death by targeting the eukaryotic ribosome, *Sci. Rep.*, **6**, 27720, doi: 10.1038/srep27720.
81. Andreev, D. E., Dmitriev, S. E., Terenin, I. M., Prassolov, V. S., Merrick, W. C., and Shatsky, I. N. (2009) Differential contribution of the m7G-cap to the 5' end-dependent translation initiation of mammalian mRNAs, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 6135-6147, doi: 10.1093/nar/gkp665.
82. Thoreen, C. C., Chantranupong, L., Keys, H. R., Wang, T., Gray, N. S., and Sabatini, D. M. (2012) A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation, *Nature*, **485**, 109-113, doi: 10.1038/nature11083.
83. Ingolia, N. T., Lareau, L. F., and Weissman, J. S. (2011) Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes, *Cell*, **147**, 789-802, doi: 10.1016/j.cell.2011.10.002.
84. Gerashchenko, M. V., Peterfi, Z., Yim, S. H., and Gladyshev, V. N. (2021) Translation elongation rate



- varies among organs and decreases with age, *Nucleic Acids Res.*, **49**, e9, doi: 10.1093/nar/gkaa1103.
85. Anderson, P., and Kedersha, N. (2006) RNA granules, *J. Cell Biol.*, **172**, 803-808, doi: 10.1083/jcb.200512082.
  86. Ripin, N., and Parker, R. (2022) Are stress granules the RNA analogs of misfolded protein aggregates? *RNA*, **28**, 67-75, doi: 10.1261/rna.079000.121.
  87. Fritsch, C., Herrmann, A., Nothnagel, M., Szafranski, K., Huse, K., Schumann, F., Schreiber, S., Platzer, M., Krawczak, M., Hampe, J., and Brosch, M. (2012) Genome-wide search for novel human uORFs and N-terminal protein extensions using ribosomal footprinting, *Genome Res.*, **22**, 2208-2218, doi: 10.1101/gr.139568.112.
  88. Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S., and Boccaccio, G. L. (2005) Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes, *Mol. Biol. Cell*, **16**, 405-420, doi: 10.1091/mbc.e04-06-0516.
  89. Contreras, A., and Carrasco, L. (1979) Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells, *J. Virol.*, **29**, 114-122, doi: 10.1128/JVI.29.1.114-122.1979.
  90. Schuller, A. P., and Green, R. (2018) Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 526-541, doi: 10.1038/s41580-018-0011-4.
  91. Alekhina, O. M., Terenin, I. M., Dmitriev, S. E., and Vassilenko, K. S. (2020) Functional cyclization of eukaryotic mRNAs, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 1677, doi: 10.3390/ijms21051677.
  92. Baymukhametov, T. N., Lyabin, D. N., Chesnokov, Y. M., Sorokin, I. I., Pechnikova, E. V., Vasiliev, A. L., and Afonina, Z. A. (2023) Polyribosomes of circular topology are prevalent in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 908-918, doi: 10.1093/nar/gkac1208.
  93. Kedersha, N., Panas, M. D., Achorn, C. A., Lyons, S., Tisdale, S., Hickman, T., Thomas, M., Lieberman, J., McInerney, G. M., Ivanov, P., and Anderson, P. (2016) G3BP-Caprin1-USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits, *J. Cell Biol.*, **212**, 845-860, doi: 10.1083/jcb.201508028.
  94. Meyer, C., Garzia, A., Morozov, P., Molina, H., and Tuschl, T. (2020) The G3BP1-family-USP10 deubiquitinase complex rescues ubiquitinated 40S subunits of ribosomes stalled in translation from lysosomal degradation, *Mol. Cell*, **77**, 1193-1205.e1195, doi: 10.1016/j.molcel.2019.12.024.

## A SOLITARY STALLED 80S RIBOSOME PREVENTS mRNA RECRUITMENT TO STRESS GRANULES

**Artem G. Fedorovskiy<sup>1,2</sup>, Anton V. Burakov<sup>1</sup>, Ilya M. Terenin<sup>1,3</sup>, Dmitry A. Bykov<sup>1,4,5</sup>,  
Kseniya A. Lashkevich<sup>1</sup>, Vladimir I. Popenko<sup>5</sup>, Nadezhda E. Makarova<sup>1#</sup>,  
Ivan I. Sorokin<sup>1&</sup>, Anastasia P. Sukhinina<sup>1,6</sup>, Vladimir S. Prassolov<sup>5</sup>,  
Pavel V. Ivanov<sup>7</sup>, and Sergey E. Dmitriev<sup>1,5,6\*</sup>**

<sup>1</sup> *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru*

<sup>2</sup> *Faculty of Materials Science, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Sirius University of Science and Technology, 354340 Sirius, Krasnodar region, Russia*

<sup>4</sup> *Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>5</sup> *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

<sup>6</sup> *Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

<sup>7</sup> *Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, 02115 Boston, MA, USA*

In response to stress stimuli, eukaryotic cells typically suppress protein synthesis. This leads to the mRNA release from polysomes, their condensation with RNA-binding proteins, and the formation of non-membrane-bound cytoplasmic compartments called stress granules (SGs). SGs contain 40S but generally lack 60S ribosomal subunits. It is known that cycloheximide, emetine, and anisomycin, the ribosome inhibitors which block the 80S ribosome progression along mRNA and stabilize polysomes, prevent SG assembly. Conversely, puromycin, which induces premature termination, releases mRNAs from polysomes and stimulates the formation of SGs. The same effect is caused by some translation initiation inhibitors, which lead to polysome disassembly and the accumulation of mRNAs in a form of stalled 48S preinitiation complexes. Based on these and other data, it is believed that the trigger for SG formation is the presence of mRNA with extended ribosome-free segments, which tend to form condensates in the cell. In this study, we evaluated the ability of various small-molecule translation inhibitors to block or stimulate the assembly of SGs under conditions of severe oxidative stress induced by sodium arsenite. Contrary to expectations, we found that ribosome-targeting elongation inhibitors of a specific type, that arrest solitary 80S ribosomes at the beginning of the mRNA coding regions but do not interfere with all subsequent ribosomes in completing



translation and leaving the transcripts (such as harringtonine, lactimidomycin, or T-2 toxin), completely prevented the formation of arsenite-induced SGs. These observations suggest that the presence of even a single 80S ribosome on mRNA is sufficient to prevent its recruitment into SGs, and the presence of extended ribosome-free regions of mRNA is not sufficient for SG formation. We propose that mRNA entry into SGs may be mediated by specific contacts between RNA-binding proteins and those regions on 40S subunits that remain inaccessible when ribosomes are associated.

*Keywords:* stress granules, liquid-liquid phase separation, small molecule inhibitors of translation, ribosome inhibitors, elongation, polysomes, harringtonine, lactimidomycin, T-2 toxin, stalled ribosome